



REC'D 27 FEB 2004

WIPQ

PCT

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per **Invenzione Industriale**

N.

MI2002 A 002745

EP03/14732

*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

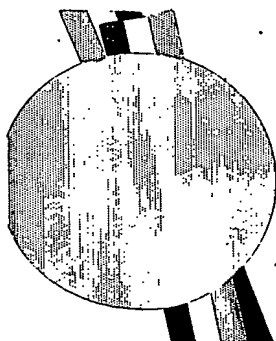
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

29 GEN. 2004

Roma, il

IL DIRIGENTE

Paola
Dr.ssa Paola Giuliano



PCT/EP 03 / 14 / 32

3.02.04

3505PTIT

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **COIMEX srl UNITED COMPANIES**Residenza **REGGIO EMILIA**codice **01595420356**

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr.ssa Gemma Gervasi ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**via **C.so di Porta Vittoria**

n.

9

città **Milano**cap **20122**(prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) **COBB**

gruppo/sottogruppo

Esteri misti dell'acido ialuronico ad attività citostatica e prodifferenziante e procedimento per la loro produzione

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI

NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **PERBELLINI Alberto**

3)

2) **CORADINI Danila**

4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) **nessuna**

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **34**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) **2** **PROV** n. tav. **07**

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) **0** **RIS**

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4) **0** **RIS**

designazione inventore

Doc. 5) **0** **RIS**

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) **0** **RIS**

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) **0**

nominativo completo del richiedente

81 attestati di versamento, totale Euro

Duecentonovantuno/80.=

obbligatorio

COMPILATO IL **23/12/2002**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Gemma GervasiCONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO** **MILANO**codice **1155**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 002745

Reg. A.

L'anno **DUEMILADUE**il giorno **VENTITRE**del mese di **DICEMBRE**

Il(i) richiedente(i) sopradicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto di n.

001 fogli aggluntivi per la concessione del brevetto sopraportato.I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE **IL RAPPRESENTANTE PUR INFORMATO DEL CONTENUTO****DELLA CIRCOLARE N. 4235 DEL 01/03/2001 EFFETTUA IL DEPOSITO****CON RISERVA DI LETTERA DI INCARICO.**

IL DEPOSITANTE,

L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRELIMINARE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI2002A 002743

REG. A

DATA DI DEPOSITO

23/12/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

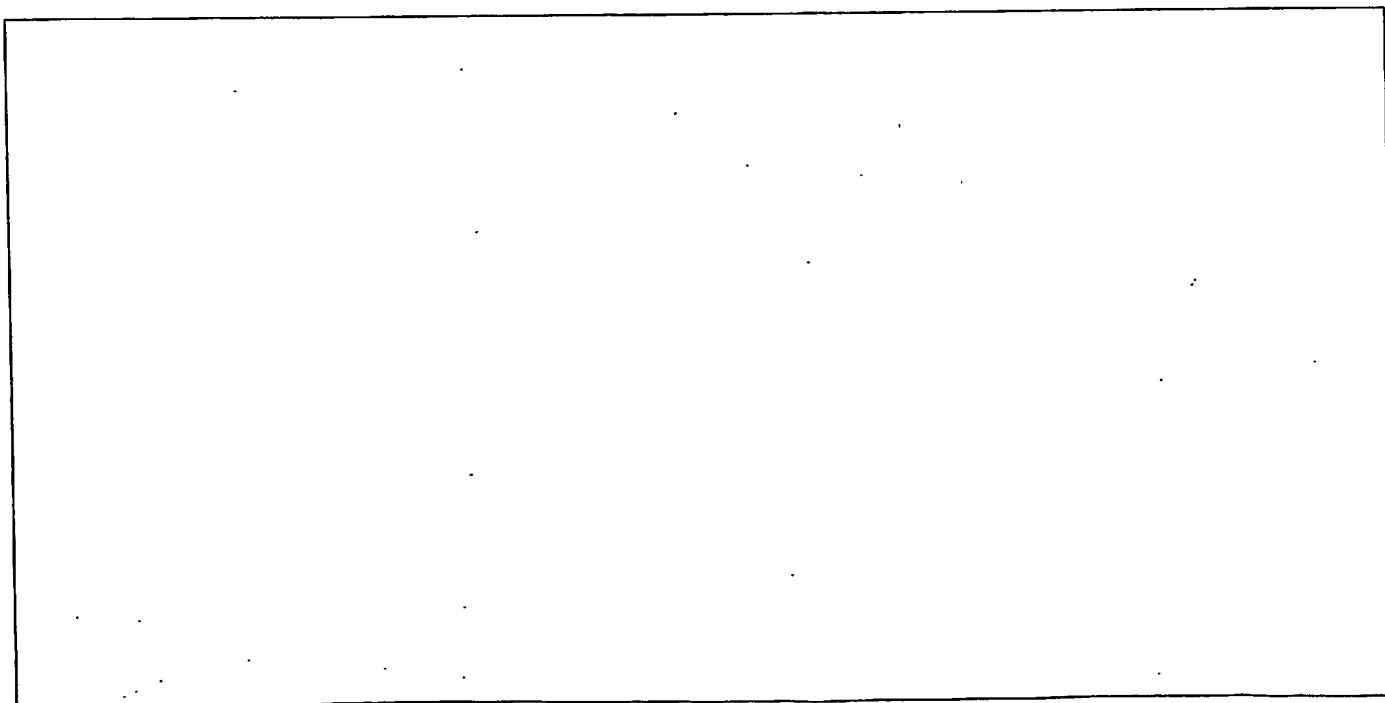
Esteri misti dell'acido ialuronico ad attività citostatica e prodifferenziante e
procedimento per la loro produzione

L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda esteri misti dell'acido ialuronico in cui i gruppi ossidrilici vengono parzialmente esterificati con gli acidi retinoico e butirrico. Tali esteri misti, caratterizzati da specifici gradi di esterificazione e da un alto rapporto tra il grado di sostituzione dell'acido butirrico e dell'acido retinoico, sono dotati di una elevata attività di inibizione della proliferazione cellulare associata ad attivazione del differenziamento, con conseguente rilevanza clinica nel trattamento di patologie iper-proliferative e in particolare di quelle tumorali sia solide che sistemiche



M. DISEGNO



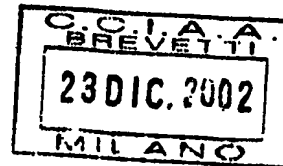
Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Esteri misti dell'acido ialuronico ad attivita' citostatica e prodifferenziante e procedimento per la loro produzione"

a nome di COIMEX srl UNITED COMPANIES

con sede in REGGIO EMILIA

Inventori designati: PERBELLINI Alberto, CORADINI Danila



MI 2002A 002745

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è relativa a nuovi farmaci antitumorali sviluppati a partire da composti polisaccaridici dotati di caratteristiche di veicolazione particolarmente mirate.

TECNICA ANTERIORE

L'acido retinoico e l'acido butirrico sono due molecole utilizzate nel trattamento di patologie iper-proliferative, in particolare di quelle neoplastiche.

L'acido butirrico (d'ora in poi riferito come AcBu) è uno dei principali acidi grassi a catena corta derivanti dalla fermentazione dei carboidrati complessi introdotti con la dieta (Hill MJ. Eur J Cancer Prevention 4:897-904, 1995; Cummings JH., Gut 22:763-779, 1981) ed è fisiologicamente presente nel colon a concentrazioni millimolari, dove regola il turnover delle cellule epiteliali della mucosa inducendo il differenziamento cellulare e la morte cellulare programmata o apoptosi (Jass JR. Med Hypotheses 18:113-118, 1985; Guibaud NF, Gas N, Dupont MA, Valette A., J Cell Physiol 145:162-172, 1990). Evidenze sperimentali, accumulate su una consistente serie di linee cellulari, rappresentative

dei tumori solidi umani più diffusi (Coradini D, Biffi A, Costa A et al., Cell Prolif 30:149-159, 1997; Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D et al., Cell Prolif 33:139-146, 2000; Pellizzaro C, Coradini D, Abolafio G et al., Int J Cancer 91:658-664, 2001), hanno ampiamente dimostrato che, oltre a svolgere questo importante ruolo fisiologico, l'AcBu è in grado di inibire anche la crescita tumorale.

Il meccanismo d'azione alla base di tale attività sembra essere principalmente basato sull'inibizione dell'attività degli enzimi iston-deacetilasi (HDAC), importanti componenti del complesso di regolazione della trascrizione genica.

L'acido retinoico (d'ora in poi riferito come AR) è un acido monocarbossilico polinsaturo a 20 atomi di carbonio e costituisce la forma ossidata della vitamina A, nota per le sue importanti funzioni biologiche nel processo della visione, nel mantenimento della funzione cutanea, nell'emopoiesi e nello sviluppo embrionale (Lotan R, Biochem Biophys Acta 605:33-37,1980; Dower D, Koeffler HP., Exp Cell Res 138:193-199,1982). Il meccanismo d'azione dell'AR è strettamente correlato alla presenza di recettori endocellulari specifici (retinoic acid receptor, RAR), appartenenti alla classe dei fattori di trascrizione ligando-dipendenti, che regolano l'espressione di geni responsabili del differenziamento cellulare. Per le sue proprietà differenzianti, l'AR e derivati vengono da tempo utilizzati nel trattamento di diverse patologie iper-proliferative tra cui quelle neoplastiche (Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, et al., Carcinogenesis 21:1271-279,2000; DelUca LM, Kosa K, Andreola F., J Nutr Biochem 8:426-437,1997).

Sebbene dotati di indubbie proprietà antiproliferative, AcBu e AR sono di difficile impiego clinico a causa della rapida metabolizzazione del primo e della tossicità del secondo principalmente legata al fenomeno di accumulo che si instaura a dosaggi elevati.

Tali inconvenienti possono essere superati dal legame di questi principi attivi a molecole carrier che, se opportunamente scelte, oltre a stabilizzare la molecola senza alterarne le proprietà, possono aumentarne la biodisponibilità e veicarli in modo specifico alle cellule bersaglio con conseguente incremento dell'efficacia farmacologica e diminuzione degli effetti collaterali.

Tra le possibili molecole carrier, l'acido ialuronico (d'ora in poi riferito come HA) è risultato di particolare interesse applicativo per la veicolazione mirata di molecole biologicamente attive, ma caratterizzate da problemi fisico-chimici che ne ostacolano l'uso clinico. L'acido ialuronico, infatti, è riconosciuto da un recettore di membrana specifico, CD44, sovra-espresso dalle cellule attivamente proliferanti, ed in particolare dalle cellule tumorali (Rudski Z and Jothy S., J Clin Pathol: Mol Pathol 50:57-71, 1997). Chimicamente l'HA è un polisaccaride, costituito da unità disaccaridiche di acido glucuronico e N-acetilglucosammina, con un peso molecolare anche di milioni di Dalton, in cui i gruppi ossidrilici sono parzialmente esterificabili.

È proprio grazie a questi gruppi esterificabili che, dal legame dell'HA con AcBu, è stato possibile ottenere un pro-farmaco in grado di stabilizzare chimicamente l'AcBu, consentirne la veicolazione mirata alle cellule che sovra-esprimono il recettore CD44 potenziandone significativamente



l'effetto antiproliferativo (Coradini D, Pellizzaro C, Miglierini G, et al., Int J Cancer 81:411-416, 1999). Esteri butirrici dell'HA ad elevata attività antiproliferativa sono stati descritti nella domanda di brevetto WO98/23648. Esteri polisaccaridici dell'acido retinoico sono descritti nella domanda di brevetto italiana TS2001A000017)

Sebbene di rilevante interesse clinico, la sintesi di un pro-farmaco costituito da una singola molecola carrier veicolante due diversi principi attivi, potrebbe comportare alcuni inconvenienti chimico-fisici, principalmente dovuti all'ingombro sterico della prima molecola aggiunta al carrier con riduzione della reattività di quest'ultimo nei confronti della seconda molecola da legare, che renderebbe la reazione più difficoltosa e meno controllabile. Inoltre, una volta realizzata, la doppia sostituzione potrebbe modificare profondamente la struttura del carrier influenzando in modo imprevedibile sulle sue proprietà di solubilità, permeabilità, e sito-specificità. Infine, il rilascio delle due molecole attive dal carrier potrebbe avvenire secondo cinetiche diverse e tra loro competitive, con la conseguenza che la mera veicolazione congiunta dei due principi attivi non garantirebbe la loro contemporanea biodisponibilità al sito d'azione. La presente invenzione risponde, dunque, alla necessità di veicolare in modo efficace gli acidi retinoico e butirrico con una stessa molecola e risolvere, al contempo, le problematiche insite nella presenza contemporanea dei due principi attivi sulla stessa molecola carrier.

SOMMARIO

I presenti inventori hanno ottenuto nuovi esteri misti dell'acido ialuronico con gli acidi retinoico e butirrico. Questi esteri sono caratterizzati da un

rapporto tra grado di sostituzione con acido butirrico e quello con acido retinoico di almeno 6, ancor più preferibilmente superiore a 10. Essi sono inoltre caratterizzati da un grado di sostituzione con acido butirrico ancor più preferibilmente compreso tra 0.05 e 1.0, preferibilmente compreso tra 0.1 e 0.35 e da un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.002 e 0.1, ancor più preferibilmente compreso tra 0.01 e 0.05.

Gli esteri misti con queste caratteristiche permettono, quindi, il raggiungimento di una concentrazione farmacologicamente efficace degli acidi butirrico e retinoico al sito bersaglio potenziandone l'attività biologica. Gli effetti citostatico e differenziante dei due principi attivi risultano infatti addirittura qualitativamente e quantitativamente superiori a quelli ottenibili con i due acidi somministrati singolarmente o come associazione dei due monoesteri ottenuti per esterificazione con l'acido ialuronico.

L'attività citostatica e differenziante degli esteri qui descritti permette quindi di trattare, con maggiore efficacia rispetto alle terapie correnti, quelle patologie caratterizzate da condizioni di iper-proliferazione cellulare, incluse le neoplasie umane sia solide che sistemiche.

Gli esteri dell'invenzione danno luogo a soluzioni a bassa viscosità e buona solubilità e sono pertanto formulabili in composizioni farmaceutiche facilmente somministrabili all'uomo e all'animale.

La presente invenzione comprende, inoltre, un procedimento di preparazione dei suddetti esteri che prevede la formazione di un alcolato di acido ialuronico in condizioni particolari di reazione: l'alcolato viene

fatto reagire prima con acido retinoico e poi con acido butirrico. Tale procedimento permette di ottenere agevolmente i gradi di sostituzione desiderati insieme a una degradazione controllata del peso molecolare dell'acido ialuronico nativo entro un intervallo medio-basso.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Confronto tra l'effetto antiproliferativo di dosi scalari di estere misto retinoato-butirrato dell'acido ialuronico, monoestere butirrico o monoestere retinoico in cellule di carcinoma mammario umano (MCF7).

Dopo 6 giorni di trattamento continuo con dosi scalari di estere misto dell'invenzione (intervallo 2 - 0.0001 mg/ml), monoestere butirrico (intervallo 4 - 0.03 mg/ml) o monoestere retinoico (intervallo: 4 - 0.0001 mg/ml), l'effetto sulla crescita cellulare è stato valutato, con metodo colorimetrico (MTT), in termini di percentuale di inibizione rispetto al controllo (costituito da cellule mantenute nel solo terreno di coltura). Ad ogni concentrazione testata, l'estere misto esplica un'attività antiproliferativa superiore a quella delle corrispondenti concentrazioni di entrambi i monoesteri suggerendo un potenziale effetto sinergico tra i due principi attivi contemporaneamente presenti sulla stessa molecola carrier.

Monoestere (HA-AcBu): -■- ; monoestere (HA-RA): -●- ; estere misto dell'acido ialuronico con gli acidi retinoico e butirrico (HA-AcBu/RA): -▲-.

Figura 2. Effetto di dosi scalari di estere misto retinoato-butirrato dell'acido ialuronico sulla crescita di cellule promielo/monocitiche (U937 e HL-60). Dopo 6 giorni di trattamento con dosi scalari di estere

misto (intervallo di concentrazione: 1-0.0001 mg/ml), l'effetto del composto sulla crescita cellulare è stato valutato, con metodo colorimetrico (MTT), in termini di percentuale di inibizione rispetto al controllo (costituito da cellule mantenute nel solo terreno di coltura). La crescita di entrambe le linee cellulari viene solo parzialmente inibita. Infatti, anche in presenza della concentrazione massima somministrata di 1 mg/ml, corrispondente alla concentrazione 10^{-4} M di AR e 2 mM di AcBu (concentrazioni alle quali entrambi i principi attivi inducono quasi il 100% di inibizione della crescita), si osserva solo un'inibizione del 40% nelle U937 e del 48% nelle HL-60, nonostante la presenza del recettore CD44 specifico per l'acido ialuronico, precedentemente verificata mediante citometria a flusso. Cellule U937: ■- ; HL60: -●- .

Figura 3. Perturbazioni del ciclo cellulare indotte dall'estere misto retinoato-butirrato dell'acido ialuronico nella linea cellulare promielo/monocitica U937. La valutazione è stata eseguita mediante citometria a flusso (pannelli a, b, c,) dopo 6 giorni di trattamento continuo con l'estere misto alla concentrazione di 0.1 o 1 mg/ml ed è stata messa in relazione con l'effetto indotto sulla crescita cellulare valutata con metodo colorimetrico (MTT), descritto dalla curva -●-. Pannello a): controllo ($G_0=42\%$; $S=44\%$; c): estere misto in concentrazione 0.1 mg/ml ($G_0=94\%$; $S=3\%$) e d): estere misto in concentrazione 1 mg/ml ($G_0=91\%$; $S=5\%$).

Figura 4. Confronto tra l'effetto degli esteri misti dell'invenzione ed il principio attivo NaB sulla proliferazione della linea cellulare promielocitica U937.

È riportato l'effetto di inibizione della crescita indotto da tre doppi esteri (HRE23, HRE24 e IS16/01/02) rispetto a NaB (sodio butirrato). HRE23, HRE24, IS16: esteri misti secondo l'invenzione.

Figura 5. Confronto tra l'effetto degli esteri misti dell'invenzione ed il principio attivo sulla crescita della linea cellulare promielocitica U937.

È riportato l'effetto indotto da tre doppi esteri (HRE23, HRE24 e IS16/01/02) rispetto a RA (acido retinoico). HRE23, HRE24, IS16: esteri misti secondo l'invenzione.

Figura 6. Effetto dell'estere misto retinoato-butirrato e dei due principi attivi (acido butirrico e acido retinoico) nella linea cellulare promielo/monocitica U937.

L'effetto è stato valutato sul ciclo e sulla proliferazione cellulare: la valutazione è stata eseguita mediante citometria a flusso dopo 3 giorni di trattamento con l'estere misto dell'invenzione alla concentrazione di 0.1 mg/ml, acido butirrico o acido retinoico, rispettivamente alla concentrazione di 0.2 mM e 10^{-5} M. Le perturbazioni indotte dai composti sul ciclo cellulare sono state messe in relazione con l'effetto sulla proliferazione cellulare (asse delle ordinate) esercitato dalle stesse concentrazioni di farmaci ed espresso come percentuale rispetto al controllo (CTR), costituito da cellule mantenute in solo terreno di coltura. L'analisi citometrica indica che, dopo 3 giorni di trattamento, l'estere misto induce già il massimo dell'inibizione con un blocco del ciclo cellulare in fase $G_{0/1}$ del 72%, mentre l'AcBu a 0.2 mM è del tutto inefficace sia nell'indurre un effetto antiproliferativo che un blocco del



ciclo cellulare e l'AR 10^{-5} M riduce notevolmente la crescita cellulare con un concomitante blocco delle cellule nella fase $G_{0/1}$ del ciclo.

CTR: controllo. Pannello a): ($G_0=45\%$; $S=46\%$), pannello b): ($G_0=44\%$; $S=45\%$); pannello c) ($G_0=43\%$; $S=45\%$); pannello d): ($G_0=72\%$; $S=22\%$); pannello e) ($G_0=41\%$; $S=46\%$), pannello f): ($G_0=94\%$; $S=2\%$).

Figura 7. Valutazione comparata dell'effetto citostatico e pro-differenziante dei composti dell'invenzione rispetto ai principi attivi puri o in forma di monoestere, somministrati singolarmente o in associazione nella linea cellulare promielo/monocitica U937.

Il grafico riporta in modo sintetico gli effetti indotti dai vari composti, somministrati da soli o in associazione, sulla crescita cellulare (espressa come percentuale di cellule ferme nella fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare, % asse delle ordinate) e sul differenziamento (valutato come percentuale di cellule esprimenti l'antigene CD11b). La valutazione, eseguita mediante citometria a flusso dopo 3 giorni di trattamento con i vari composti somministrati alla concentrazione corrispondente a quella presente nell'estere misto alla dose di 0.1 mg/ml, indicata in figura.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

I nuovi composti oggetto della presente invenzione sono esteri misti (HA-AcBu/RA) dell'acido ialuronico con gli acidi retinoico e butirrico. In questi esteri, i gruppi ossidrilici dell'acido ialuronico sono parzialmente sostituiti con i residui acilici dell'acido retinoico (AR) e dell'acido butirrico (AcBu).

Tali esteri misti sono caratterizzati da un quantitativo di acido butirrico maggiore rispetto a quello di acido retinoico secondo un rapporto tra il grado di sostituzione con butirrato e quello con retinoato di almeno 6 ($DS\ AcBu/AR \geq 6$) o, ancor più preferibilmente, superiore a 10. Ancor più preferibilmente tali esteri hanno un grado di sostituzione con acido butirrico compreso tra 0.05 e 1.0, o ancor più preferibilmente compreso tra 0.1 e 0.35 ed un grado di sostituzione con acido retinoico compreso tra 0.002 e 0.1, o ancor più preferibilmente compreso tra 0.01 e 0.05.

Essi hanno inoltre preferibilmente un peso molecolare compreso tra 10.000 e 30.000 Dalton.

Per "peso molecolare" si intende il peso molecolare medio ponderale (MW), del solo acido ialuronico, escludendo cioè il contributo dei residui butirrici e retinoici.

Per "grado di sostituzione" si intende il numero di ossidrilici esterificati per ogni unità ripetitiva dell'acido ialuronico (dimero GlcNAc-GlcUA).

Con il termine "acido retinoico" o "(AR)" si intendono tutte le forme isomeriche in cui si presenta questo composto, quindi sia la forma naturale (con tutti i doppi legami in forma *trans*), che tutte le altre forme isomeriche possibili.

Gli esteri misti dell'HA descritti nella presente invenzione veicolano contemporaneamente ad un sito cellulare bersaglio, quantità farmacologicamente efficaci degli acidi retinoico e butirrico, pertanto sia l'attività prodifferenziante che l'effetto citostatico sono qualitativamente e quantitativamente superiori rispetto a quelli ottenibili con i due acidi somministrati singolarmente o in forma di associazione di monoesteri con l'acido ialuronico.

In particolare, l'associazione dei due monoesteri (HA-AcBu e HA-RA utilizzati comparativamente), pur ottenendo lo stesso effetto di inibizione della crescita, non è in grado di indurre alcun differenziamento cellulare significativo. Ciò permette di giustificare le notevoli potenzialità dell'estere misto rispetto sia ai singoli principi attivi, che ai loro monoesteri da soli o in associazione.

L'attività antiproliferativa dei suddetti esteri misti si esplica attraverso un'azione citostatica, valutabile attraverso l'inibizione della crescita cellulare, dovuta ad un blocco delle cellule nella fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare, cui segue l'attivazione del differenziamento cellulare o, ad alte concentrazioni, della morte cellulare o apoptosi. L'induzione del differenziamento cellulare si può seguire attraverso la ri-espressione di antigeni di membrana specifici per l'istotipo considerato, ad esempio nel caso di cellule promielocitiche con l'attivazione degli antigeni di superficie CD11a e CD11b.

Gli esteri misti della presente invenzione permettono, quindi, di bloccare la crescita tumorale e ripristinare il processo di maturazione cellulare o di indurre, nella maggior parte dei tumori, la morte cellulare in modo dose-



dipendente determinando così sia un effetto di controllo della malattia che la sua cura. L'applicazione è pertanto vantaggiosa sia nella terapia di tumori solidi che nella terapia dei tumori sistemici, anche se può risultare particolarmente vantaggiosa nella terapia dei tumori della linea promielocitica e specificamente della leucemia promielocita acuta (APL) per lo spiccato effetto prodifferenziante.

Nel caso dell'APL, è infatti ipotizzabile un meccanismo diretto dipendente dalla presenza del recettore chimerico caratteristico di tale patologia. L'attività biologica particolarmente elevata degli esteri dell'invenzione è riferibile alla possibilità di agire ad un doppio livello: inibendo l'attività delle HDAC (istone-deacetilasi, che inibiscono il normale sviluppo differenziativo) mediante i residui butirrici e inducendo contemporaneamente il differenziamento grazie alla presenza dei residui retinoici presenti sulla molecola carrier. In particolare, in cellule della linea promielocitica, gli esteri dell'invenzione inducono la ri-espressione degli antigeni di superficie CD11a e CD11b.

Condizione utile per esercitare tali effetti è la presenza, sulle cellule tumorali, del recettore CD44 specifico per l'acido ialuronico. Tale presenza è stata ampiamente dimostrata nella maggior parte dei tumori solidi umani inclusi, per esempio, gli adenocarcinomi della mammella, del colon, del polmone, il melanoma, così come in alcune neoplasie sistemiche quali l'APL.

Grazie alle loro caratteristiche peculiari, gli esteri misti dell'invenzione consentono: (i) di ottenere un adeguato dosaggio e un'elevata biodisponibilità di entrambi gli acidi al loro sito di azione, (ii) di

mantenere la sito-specificità dell'acido ialuronico utilizzato come molecola carrier, (iii) di ottenere nuovi effetti farmacologici utili per migliorare il trattamento delle patologie tumorali, (iv) di ottenere un farmaco con caratteristiche chimico-fisiche tale da renderlo facilmente somministrabile, (v) di diminuire la tossicità di dosi efficaci di acido retinoico.

Infatti, l'attività dei composti descritti, non è riconducibile ad una mera sommatoria delle attività dei due principi attivi (AR e AcBu), ma piuttosto ad un sinergismo di tipo qualitativo e quantitativo inaspettato probabilmente legato alla contemporanea presenza dei due principi attivi sulla stessa molecola carrier che consente l'interazione a livello cellulare tra AR e AcBu diversamente da quanto ottenibile coi singoli esteri forniti in miscela. E' indicativo, infatti, che gli esteri misti dell'invenzione potenzino l'effetto ottenibile con la semplice associazione dell'acido retinoico e butirrico o dei loro monoesteri con acido ialuronico.

Gli effetti osservati sulla crescita cellulare e sul differenziamento somministrando gli esteri della presente invenzione a cellule esprimenti recettore per l'acido ialuronico (CD44) sono completamente inaspettati sia rispetto al comportamento dei due acidi retinoico e butirrico, da soli o in miscela fisica, sia rispetto alla somministrazione contemporanea come singoli monoesteri dell'acido ialuronico.

L'analisi citometrica mostra infatti che dopo soli 3 giorni di trattamento con l'estere misto dell'invenzione si ottiene già il massimo dell'inibizione della crescita cellulare ed il blocco del ciclo cellulare in fase $G_{0/1}$ nel 72% della popolazione cellulare. I risultati ottenuti con i due principi attivi,

addizionati singolarmente, sono invece in linea con quanto atteso con le concentrazioni somministrate, ossia a 0.2 mM, l'AcBu è del tutto inefficace sia nell'indurre un effetto antiproliferativo che un blocco del ciclo cellulare, mentre l'acido retinoico ad una concentrazione di circa 10^{-5} M (corrispondente a quella presente sull'estere misto somministrato ad una concentrazione di 0.1 mg/ml) è, come noto, citotossico.

L'estere misto dell'invenzione consente quindi la somministrazione di dosi di AR altrimenti citotossiche e non utilizzabili a scopo terapeutico unendole ad un contemporaneo effetto prodifferenziante.

La superiore attività biologica osservata con gli esteri misti nei confronti dell'associazione dei due monoesteri può essere almeno in parte ascrivibile all'assenza di un antagonismo meccanico tra i due monoesteri nella cinetica di legame allo stesso recettore.

In sintesi i richiedenti hanno osservato che:

- sul piano quantitativo, gli esteri misti di HA con AR e AcBu, in accordo con la presente invenzione, mostrano un effetto antiproliferativo, citotossico o citostatico, dose-dipendente ed un effetto prodifferenziante su cellule derivate da tumori solidi e sistemici con un'attività decisamente superiore a quella ottenibile con i due acidi singoli, con la loro miscela fisica, o con i loro monoesteri ialuronici;
- sul piano qualitativo i due acidi da soli, la loro miscela fisica e i monoesteri con acido ialuronico presentano tutti un effetto differenziante decisamente inferiore rispetto all'effetto di blocco della crescita cellulare (si noti che sia l'effetto antiproliferativo che quello

prodifferenziante sono estremamente utili nella terapia antitumorale);
gli esteri della presente invenzione sono invece gli unici capaci di
produrre effetti consistenti su entrambi i parametri.

In particolare, in un sistema *in vitro* rappresentato dalla linea cellulare U937, è stato osservato che, all'interno dell'intervallo del grado di sostituzione preferito, sia per AcBu che per AR, gli esteri misti con un grado di sostituzione più basso sia per AcBu che per AR, hanno una IC_{50} (concentrazione alla quale si ha 50% dell'effetto antiproliferativo) anche inferiore a 1 nM.

Diversamente, gli esteri misti caratterizzati da un più alto grado di sostituzione sia di AcBu che di AR all'interno dell'intervallo del grado di sostituzione preferito, in presenza della concentrazione di 1 mg/ml, corrispondente alla concentrazione $10^{-4}M$ di AR e 2 mM di AcBu (concentrazioni alle quali la somministrazione di entrambi i principi attivi tal quali induce quasi il 100% di inibizione della crescita con un effetto prevalentemente citotossico), danno una inibizione della crescita del 40% e del 48% nelle HL-60. Questo effetto antiproliferativo è però accompagnato da un notevole aumento della percentuale (> 90%) di cellule bloccate nella fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare e dalla comparsa di antigeni specifici del differenziamento cellulare.

Altra caratteristica vantaggiosa degli esteri della presente invenzione, è la riduzione controllata del peso molecolare dell'HA che riduce l'ingombro sterico della molecola finale (a vantaggio della sua biodisponibilità), ne migliora le caratteristiche di solubilità, ne riduce la viscosità in soluzione e la rende più facilmente somministrabile all'uomo



e all'animale. Tutto ciò viene ottenuto senza alterare la capacità veicolante sito-specifica propria dell'acido ialuronico nativo.

Gli esteri ialuronici della presente invenzione possiedono infatti caratteristiche ottimali di solubilità e bassa viscosità tali da permettere una loro facile formulazione e una somministrazione agevole e senza rischi anche nel caso di somministrazioni endovenose o intramuscolare.

Gli esteri misti dell'invenzione possono essere infatti preparati sotto forma di soluzione acquosa fino ad una concentrazione di almeno 2 mg/ml.

Il procedimento per la sintesi dei suddetti esteri misti dell'HA costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione. Esso è caratterizzato da un passaggio di esterificazione con derivati dell'acido retinoico effettuato prima dell'esterificazione con derivati dell'acido butirrico.

Preferibilmente il procedimento è caratterizzato dalle seguenti fasi, nell'ordine indicato:

- i) formazione di un alcolato di acido ialuronico;
- ii) esterificazione dell'alcolato ottenuto in i) con derivati dell'acido retinoico ad ottenere un monoestere retinoico dell'acido ialuronico;
- i) esterificazione del monoestere ottenuto in ii) con derivati dell'acido butirrico ad ottenere suddetto estere misto dell'acido ialuronico.

E' essenziale che l'esterificazione con AR avvenga prima di quella con AcBu; è inoltre preferibile che prima dell'esterificazione con AR, si

trasformi l'acido ialuronico nel rispettivo alcolato nelle condizioni indicate al punto i).

L'HA di partenza può essere utilizzato come tale o in forma salificata; esempio preferito di sali dell'acido ialuronico sono i sali ammonici quaternari, quale il sale tetrabutylammonico. L'acido ialuronico è commercialmente disponibile ed ha un peso molecolare generalmente compreso tra 10^4 e 10^7 Daltons.

L'alcole utilizzato nel passaggio i), è preferibilmente un alcole C1-C5, più preferibilmente metanolo. Il pH dell'ambiente di reazione deve essere superiore o uguale a 13 e viene ottenuto includendo una base nella miscela di reazione: la scelta della base non è determinante.

La reazione procede a temperatura ambiente, per un tempo medio di 2-3 ore. In queste condizioni l'acido ialuronico subisce una riduzione controllata del peso molecolare e, al contempo, i suoi gruppi ossidrilici si trasformano in alcolato, attivandosi per la successiva reazione con l'acido retinoico; l'alcolato così ottenuto viene isolato dall'ambiente di reazione (ad es. rimuovendo il solvente mediante liofilizzazione). L'acido ialuronico è preferibilmente utilizzato in forma di sale ammonico quaternario, mentre la reazione di esterificazione di cui al punto ii) è preferibilmente effettuata utilizzando, come agente esterificante, retinoil cloruro. Per effettuare il passaggio ii) l'alcolato ottenuto nel passaggio i) viene preferibilmente disperso in dimetilformammide e posto a contatto con una soluzione di retinoil-cloruro, precedentemente preparata a parte.

Per effettuare il passaggio iii) si segue preferibilmente la seguente

procedura: il monoestere retinoico ottenuto in ii), eventualmente purificato, viene disperso in dimetilformammide e trietilammina; alla dispersione si aggiunge quindi anidride butirrica e dimetilamminopiridina, fino a completamento della esterificazione.

Se desiderato, l'estere misto può essere ulteriormente purificato mediante lavaggi, dialisi, passaggio su resine a scambio ionico, ecc.

La presente invenzione comprende, inoltre, qualsiasi composizione farmaceutica contenente gli esteri misti sopra descritti da soli o in associazione con gli eccipienti farmaceuticamente accettabili più adatti alla formulazione. Esempi di tali formulazioni farmaceutiche sono soluzioni, sospensioni, polveri solubili, compresse, granuli, microcapsule, capsule molli o rigide, compresse rivestite, suppositori, ovuli, pomate, gel, ecc.

L'invenzione comprende l'uso in terapia dei suddetti esteri e delle loro composizioni farmaceutiche. In particolare, l'invenzione è diretta all'uso dei suddetti esteri misti nella preparazione di farmaci ad azione antiproliferativa e pro-differenziante utili nella terapia antitumorale con particolare indicazione per le patologie tumorali sistemiche quali la leucemia promielocitica acuta.

Le proprietà antiproliferative degli esteri dell'invenzione li rendono inoltre utili nel trattamento delle patologie associate a iperproliferazione cellulare, quali ad es. malattie infiammatorie intestinali, morbo di Crohn, colite ulcerosa, psoriasi, ipercheratosi, iperplasia prostatica, iperproliferazione sinoviale.

La via di somministrazione può essere scelta, ad es., tra quella orale,

endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, rettale, intracavitaria, vaginale, percutanea, topica, ecc.

L'invenzione viene ora descritta mediante i seguenti esempi sperimentali che non ne rappresentano però alcuna limitazione.



PARTE SPERIMENTALE

Materiali e metodi.

Culture cellulari.

Le linee cellulari MCF7, U937 e HL-60 furono acquistate presso American Tissue Culture Collection (Rockville, MS). Le MCF7 furono cresciute in DMEM/F12 addizionato con 5% FBS, mentre le U937 e HL-60 in RPMI-1640 con 10% (v/v) siero fetale bovino.

Proliferazione cellulare.

Furono utilizzate circa 1000 cellule per pozzetto (MCF7) e 500 (U937 e HL-60) in piastre da 96 pozzetti e trattate come indicato negli esempi. Alla fine dell'esperimento l'effetto antiproliferativo fu misurato con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). L'assorbanza fu sottratta del bianco costituito da pozzetti contenenti tutti i componenti ma privi di cellule.

Citometria a flusso.

L'espressione degli antigeni CD44, CD11a, CD11b, CD18 fu misurata utilizzando specifici anticorpi monoclonali murini ed anticorpi secondari anti-topo coniugati con FITC. Dopo immunofluorescenza le cellule furono incubate in una soluzione contenente ioduro di propidio (PI) (5 µg/ml), Rnase (10 kU/ml), e Nonidet P40 (0.005%). La fluorescenza relativa al PI fu misurata mediante FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) dotato di laser ad argon a lunghezza d'onda di eccitazione 488 nm e con filtro a 610 nm. Il segnale fu raccolto in modo lineare e logaritmico. I dati furono elaborati mediante LYSIS II software.

Per valutare le alterazioni del ciclo cellulare le cellule furono risospese in

una soluzione contenente solo ioduro di propidio, Rnase e Nonidet P40 e la fluorescenza misurata mediante FACScan flow cytometer.

Esempio 1. Preparazione dell'estere misto con maggior grado di sostituzione.

In accordo alle premesse, si sono condotte una serie di prove volte a ottenere esteri misti retinoato-butirrato dell'acido ialuronico con diversi rapporti relativi di esterificazione dell'uno o dell'altro sostituyente.

Entrando nel merito, si è optato per un approccio sequenziale di esterificazione, facendo precedere l'esterificazione con AR, stante una minor velocità di reazione. Nelle varie prove si sono modificati i rapporti stechiometrici dei reattivi allo scopo di ottenere gradi di esterificazione diversi ed anche alcune condizioni operative, ma si è mantenuto sempre lo stesso schema di sintesi:

- preparazione del TBA-alcolato di HA-TBA,
- sintesi di retinoil-cloruro da acido retinoico e ossalil-cloruro,
- esterificazione dell'HA con retinoil cloruro,
- esterificazione dell'HA-RET con anidride butirrica.

Nel dettaglio di questa prima sintesi 5,0 g di HA-TBA sono stati dispersi in 5,2 ml di TBA-OH 40% e successivamente liofilizzati. 2,4 g di acido retinoico sono stati sciolti in 20 ml di N, N-DMF anidra, mantenendo per tre ore sotto agitazione, in atmosfera di N_2 e al riparo dalla luce. Contemporaneamente 1 ml di ossalil cloruro e 1 ml di N,N-DMF sono aggiunti a 5 ml di dietiletere. Dopo 10' la soluzione di acido retinoico si gocciola, sempre in atmosfera di N_2 e al riparo dalla luce in circa 20' sotto agitazione magnetica. Al termine si lascia sotto agitazione per 1

ora.

L'alcolato di HA-TBA liofilizzato viene disperso in 300 ml di N,N-DMF. Nella soluzione ottenuta si gocciola quella precedentemente preparata di retinoil cloruro in circa 30' a t.a.

Al termine si lascia reagire sotto agitazione per ulteriori 17 ore. Il sistema così ottenuto, viene diviso in due aliquote uguali:

la prima (A) viene concentrata s.v. a 1/3 del volume iniziale e versata su 3 volumi di etere etilico. Si ottiene un precipitato che viene ridisperso in 100 ml di N,N-DMF e addizionato di 300 µl di TEA.

Le due aliquote A e B sono poi trattate con 640 µl di anidride butirrica e 2 g di DMAP, lasciando reagire in agitazione per una notte al buio e sotto N₂.

Alle aliquote sono stati poi addizionati 3 volumi di dietiletere, filtrate su Gouch, lavate con 3X100 ml di dietiletere e purificate per dialisi in 2 lt di acqua distillata.

I prodotti così purificati, sono stati poi passati su colonna di resina a scambio ionico in forma sodica e finalmente liofilizzati.

I prodotti, HRE23 e HRE24 hanno avuto rispettivamente una resa di: 0,8 g ed i seguenti gradi di sostituzione HRE23: d.s. retinoato 0,046; d.s. Butirrato 0,94 (rapporto DS HA- AcBu/DS HA-AcRe = 20.43), HRE24 una resa di 1,2 g; d.s. retinoato 0,066; d.s Butirrato 0,45 (rapporto DS HA- AcBu/DS HA-AcRe = 6.8).

Esempio 2. Preparazione dell'estere misto con minor grado di sostituzione.

1) Retinoazione

Si è ripetuta la prova precedente con una quantità dimezzata di acido retinoico e di anidride butirrica.

(a) Preparazione del TBA-alcolato di HA-TBA.

5,0 g di HA-TBA si disciolgono in 20 ml di Metanolo e 2,7 ml di una soluzione acquosa al 40% in peso di TBA-OH, lasciando reagire per una notte sotto agitazione magnetica. Si evapora il solvente a pressione ridotta e si liofilizza.

(b) Sintesi del retinoil cloruro

Sotto N₂ e al riparo dalla luce, 0,5 ml di N,N-DMF e 0,5 ml ossalil cloruro in 3 ml di dietiletere sono addizionati di una soluzione di 1,25 g di acido retinoico in 10ml di N,N-DMF mediante imbuto gocciolatore (flusso 0,5 ml/ min) e lasciati reagire per un'ora.

c) Sintesi dell'estere retinoato

L'alcolato precedentemente preparato è disciolto in 300 ml di N,N-DMF. Si aggiunge la soluzione di retinoil cloruro mediante un imbuto gocciolatore (flusso 1 ml / min) e si lascia agire per 22 ore.

2) Butirrazione

Al sistema finale di retinoazione sono aggiunti 4,0 g di DMAP e 1,3 ml di anidride butirrica, lasciando reagire per 21 ore sotto agitazione meccanica e al riparo dalla luce.

Si concentra a pressione ridotta la soluzione fino a 1/4 del volume iniziale. Si recupera il prodotto per precipitazione in 6 volumi di dietiletere. Si filtra sotto vuoto lavando con lo stesso solvente. Si discioglie il solido in acqua distillata, si dializza 4 volte contro 20 lt di acqua distillata. La soluzione purificata si fa passare 2 volte attraverso

una resina a scambio ionico Amberlite IR 120 in forma sodica (flusso 5 ml/min) e infine si liofilizza.

Si ottengono 2,74 g di estere misto (lotto IS-16). $DS_{BUT} = 0.255$; $DS_{RET} = 0.019$.



Esempio 3. Preparazione dell'estere misto su scala industriale

Si è ripetuta la prova dell'esempio 2 in scala 10/1.

1) Retinoazione

50 g di HA-TBA vennero sciolti in 300 ml di metanolo e trattati con 27 ml di TBA-OH sol. 40%

5 ml di N,N-DMF e 5 ml di ossalil cloruro vennero aggiunti in 30 ml di dietiletere ed addizionati di una soluzione di 12,5 g di acido retinoico in 100 ml di N,N-DMF.

Questa soluzione venne gocciolata di in 2,5 lt di soluzione di alcolato in N,N-DMF e per 21 ore a temperatura ambiente.

2) Butirrazione

Al retinoato così ottenuto, vennero aggiunti 20 g di DMAP e 13,2 ml di anidride butirrica. La reazione venne lasciata procedere per 24 ore e quindi il solvente evaporato sotto vuoto a max 30° C. Quindi il composto venne precipitato con l'etere e la soluzione acquosa dializzata (circa 10 lt). Il composto venne ripassato su resina in forma sodica (con grosse difficoltà). Il composto fu liofilizzato.

Esempio 4. Effetto degli esteri misti su una linea cellulare di carcinoma mammario (MCF7) e su linee cellulari tumorali promielo/monocitiche (HL60 e U937).

Il modello sperimentale prescelto era costituito da una linea cellulare di

carcinoma mammario umano (MCF7), quale esempio di neoplasia solida. Gli effetti indotti dall'estere misto furono confrontati con quelli ottenuti dai due principi attivi liberi o legati all'HA in forma di monestere. La presenza del recettore CD44, specifico per l'HA, era già stata dimostrata in precedenza (Coradini D, Pellizzaro C, Miglierini G, et al. Int J Cancer 81:411-416, 1999).

La Figura 1 mostra che, dopo 6 giorni di trattamento, dosi scalari di estere misto (range 2-0.0001 mg/ml) esplicano un'attività antiproliferativa superiore a quella delle corrispondenti concentrazioni di entrambi i monoesteri dell'acido butirrico e dell'acido retinoico (range 4-0.0001 mg/ml) suggerendo un probabile effetto sinergico tra i due principi attivi contemporaneamente presenti sulla molecola carrier. Così, ad esempio, se per ottenere l'inibizione del 50% delle cellule sono necessari 1.4 mg/ml di monoestere butirrico e 0.5 mg/ml di monoestere retinoico, è sufficiente una concentrazione di 0.08 mg/ml di estere misto per ottenere lo stesso effetto.

Quali esempio di neoplasia umana sistemica, furono scelte le linee cellulari promielo-monocitiche HL-60 e U937, che in presenza di composti differenzianti, quali l'acido retinoico, evolvono verso uno sviluppo specificamente granulocitico (HL-60) o monocitico/macrofagico (U937). Gli esteri misti saggiati sperimentalmente erano caratterizzati dai gradi di sostituzione specificati in tabella 1.

Tabella 1

Nome	DS But	DS Ret	DSBut/DSRet
HRE23	0.94	0.046	20.43
HRE24	0.45	0.066	6.6
IS16	0.255	0.019	13.14

Gli effetti indotti da diversi esteri misti furono confrontati sia con quelli ottenuti con i due principi attivi liberi che, in alcuni esperimenti (ad esempio quelli riportati nelle figure 1 e 7) con quelli ottenuti con i singoli i monoesteri dell'acido ialuronico.

Come mostrato in Figura 2, dopo 6 giorni di trattamento con dosi scalari di estere misto (0.0001 – 1 mg/ml), la crescita di entrambe le linee cellulari viene solo parzialmente inibita. Infatti, anche in presenza della concentrazione massima somministrata di 1 mg/ml, corrispondente alla concentrazione 10^{-4} M di AR e 2 mM di AcBu (concentrazioni alle quali entrambi i principi attivi inducono quasi il 100% di inibizione della crescita), si osserva solo un'inibizione del 40% nelle U937 e del 48% nelle HL-60, nonostante la presenza del recettore CD44 specifico per l'acido ialuronico verificata mediante citometria a flusso. Sorprendentemente, questo modesto effetto antiproliferativo è accompagnato da un notevole aumento della percentuale di cellule bloccate nella fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare. Infatti, come messo in evidenza dalla citometria a flusso (Figura 3), le cellule U937, trattate con l'estere misto, risultano quasi totalmente bloccate nella fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare già alla concentrazione di 0.1 mg/ml, corrispondente a 10^{-5} M di AR e di 0.2 mM di AcBu.

In figura 4 e 5 si evidenzia un'attività citotossica molto superiore al principio attivo sia nel caso dell'acido butirrico (fig.4), che nel caso dell'acido retinoico (fig.5). In particolare il composto IS16 risulta particolarmente attivo evidenziando una IC_{50} di circa 1×10^{-4} mM.

Esempio 5. Effetto degli esteri misti sull'espressione di antigeni di differenziamento

Per verificare se il blocco della crescita cellulare è accompagnato da un'attivazione del differenziamento, il modello sperimentale scelto è costituito dalla linea cellulare promielo/monocitica U937 nella quale è stato studiato l'effetto dell'estere misto sull'espressione di una serie di marcatori specifici di differenziamento mielocitico/macrofagico (CD11a, CD11b e CD18). L'effetto ottenuto è stato messo a diretto confronto con quello dei due principi attivi. Poiché le prove di crescita hanno dimostrato che già alla concentrazione di 0.1 mg/ml l'estere misto induce il massimo del blocco, gli esperimenti sono stati condotti a questa dose e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti somministrando gli acidi butirrico e retinoico alla stessa concentrazione alla quale sono presenti nell'estere misto (rispettivamente 0.2 mM e 10^{-5} M). Poiché in questi esperimenti il tempo di trattamento è stato ridotto a 3 giorni, sono stati rivalutati anche gli effetti sulla crescita e sul ciclo cellulare.

La Figura 6 indica che, dopo 3 giorni di trattamento, l'estere misto induce già il massimo dell'inibizione con un 72% delle cellule bloccate nella fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare. I risultati ottenuti con i due principi attivi, addizionati singolarmente, sono in linea con quanto atteso per le concentrazioni somministrate. Infatti, alla concentrazione di 0.2 mM,

l'AcBu è del tutto inefficace sia nell'indurre un effetto antiproliferativo che un blocco del ciclo cellulare, mentre alla concentrazione di $10^{-5}M$, notoriamente citotossica e quindi non utilizzabile a scopo terapeutico, l'AR riduce notevolmente la crescita cellulare con un concomitante blocco delle cellule nella fase $G_{0/1}$ del ciclo. L'effetto citotossico dell'AR a tale concentrazione è confermato dalle alterazioni della morfologia cellulare osservate al microscopio.

In tabella 2 vengono indicate le percentuali di espressione misurate mediante FACS su alcuni antigeni di membrana in cellule U937 trattate con gli esteri dell'invenzione e con i due principi attivi non esterificati. Il controllo è stato ripetuto per ogni trattamento e quindi indicato con i rispettivi apici.

La valutazione è stata eseguita mediante citometria a flusso dopo 3 giorni di trattamento della linea cellulare promielo/monocitica U937 con l'estere misto alla concentrazione di 0.1 mg/ml, oppure con acido butirrico alla concentrazione di 0.2 mM, oppure con acido retinoico alla concentrazione di $10^{-5}M$, utilizzando cellule linfocitarie umane come controllo negativo di espressione dell'antigene in esame.

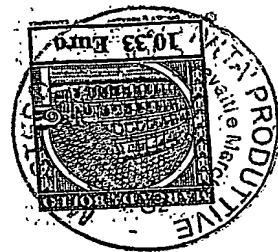


Tabella 2.

Antigeni	controllo (%)	acido butirrico ^b	acido retinoico ^c	estere misto ^a
CD44	97 ^a , 98 ^b , 98 ^c	91%	97%	91%
CD11a	66 ^a , 76 ^b , 74 ^c	76%	91%	95%
CD11b	41 ^a , 27 ^b , 29 ^c	17%	28%	70%
CD18	81 ^a , 77 ^b , 71 ^c	82%	83%	82%

Dalla lettura della tabella 2 si evince che il blocco della crescita, indotto dall'estere misto, è accompagnato dall'aumentata espressione di CD11a e CD11b. L'antigene di membrana CD18, che viene già espresso costitutivamente in percentuale elevata, non viene ulteriormente indotto.

Al contrario, l'AcBu, alla concentrazione saggiata (0.2 mM) non modifica l'espressione di nessuno dei marcatori, mentre l'AR induce l'espressione solo di CD11a, diversamente da quanto osservato per l'estere misto.

Quindi, il blocco della crescita indotto dall'estere misto, illustrato in figura 6 è accompagnato dall'aumentata espressione di CD11a e CD11b, come evidenziabile in tabella 2, che rappresentano i marcatori di differenziamento per la linea cellulare promielocitica U937, mentre l'antigene CD18, che viene già espresso costitutivamente in un'elevata percentuale di cellule, non viene ulteriormente indotto.

Nonostante sia coinvolto nel processo di uptake e di internalizzazione, l'espressione di CD44 non viene modificata dalla somministrazione dei composti dell'invenzione, probabilmente grazie al rapido turnover del recettore che ne consente, dopo l'internalizzazione, la riespressione sulla membrana cellulare, e al feedback positivo indotto dall'HA. Tale

osservazione supporta la possibilità di un trattamento continuo con l'estere misto senza la diminuzione di uptake per depauperamento recettoriale.

Quando l'effetto dell'estere misto, oltre ad essere messo a confronto diretto con in principi attivi che contiene, viene messo a confronto con i due monoesteri, singoli o in associazione, somministrati alla concentrazione corrispondenti a quelle a cui sono presenti nell'estere misto, si osserva che quest'ultimo è l'unico composto che al blocco della crescita (espresso come percentuale di cellule nella fase $G_{0/1}$ del ciclo) associa il differenziamento cellulare (espresso come percentuale di cellule esprimenti l'antigene CD11b). Infatti, come mostra la Figura 7, l'associazione dei due monoesteri, pur ottenendo lo stesso effetto di blocco della crescita, non è in grado di indurre alcun differenziamento giustificando le notevoli potenzialità dell'estere misto rispetto ai singoli principi attivi, ai loro monoesteri e all'associazione dei monoesteri.

RIVENDICAZIONI

1. Estere misto dell'acido ialuronico i cui gruppi ossidrilici sono parzialmente esterificati con molecole di acido butirrico e di acido retinoico, caratterizzato dal fatto che il rapporto tra il grado di sostituzione con acido butirrico e quello con acido retinoico è di almeno 6.
2. Estere secondo la rivendicazione 1 dove tale rapporto è almeno 10.
3. Estere secondo la rivendicazione 1 in cui grado di sostituzione con acido butirrico (AcBu) è compreso tra 0.05 e 1.0 ed il grado di sostituzione con acido retinoico è compreso tra 0.002 e 0.1
4. Estere secondo la rivendicazione 3 dove il grado di sostituzione con acido butirrico è compreso tra 0.1 e 0.35 e il grado di sostituzione con acido retinoico è compreso tra 0.01 e 0.05.
5. Estere secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che il peso molecolare medio, ponderale (MW) dell'acido ialuronico è compreso tra 10,000 e 30,000.
6. Estere secondo le rivendicazioni 1-5, per uso in terapia.
7. Procedimento per la preparazione degli esteri secondo le rivendicazioni 1-6 in cui il passaggio di esterificazione con derivati dell'acido retinoico è effettuata prima dell'esterificazione con derivati dell'acido butirrico.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7 comprendente le seguenti fasi, nell'ordine indicato:
 - i) formazione di un alcolato di acido ialuronico;
 - ii) esterificazione dell'alcolato ottenuto in i) con derivati dell'acido



- retinoico ad ottenere un monoestere retinoico dell'acido ialuronico;
- iii) esterificazione del monoestere ottenuto in ii) con derivati dell'acido butirrico ad ottenere suddetto estere misto dell'acido ialuronico.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui l'acido ialuronico è utilizzato in forma di sale ammonico quaternario.
10. Procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui al passaggio i) il pH dell'ambiente di reazione è almeno 13.
11. Procedimento secondo le rivendicazioni 7-10, in cui la reazione di esterificazione di cui al punto ii) si effettua utilizzando, come agente esterificante, retinoil cloruro.
12. Procedimento secondo le rivendicazioni 7-11, in cui la reazione di esterificazione di cui al punto iii) si effettua utilizzando, come agente esterificante, anidride butirrica.
13. Estere misto dell'acido ialuronico ad attività citostatica e pro-differenziante ottenibile mediante il processo descritto nelle rivendicazioni 7-12.
14. Composizione farmaceutica comprendente quale principio attivo uno o più esteri descritti nelle rivendicazioni 1-6 o 13 insieme ad eccipienti e/o diluenti farmacologicamente accettabili.
15. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 14, nella forma di soluzione, sospensione, polvere solubile, granulo, microcapsula, capsula molle o rigida, compressa, compressa rivestita, suppositoio, ovulo, pomata, gel.

16. Uso dell' estere misto dell'acido ialuronico secondo le rivendicazioni 1-6, per la preparazione di farmaci con attività antiproliferativa e prodifferenziante.
17. Uso secondo la rivendicazione 16, dove detto farmaco ha attività verso i tumori solidi.
18. Uso secondo la rivendicazione 16, dove detto farmaco ha attività verso i tumori sistemici.
19. Uso secondo la rivendicazione 18, dove detto tumore sistemico è leucemia acuta, leucemia promielocitica acuta, linfomi, istiocitomi.

(SM/pd)

Milano, li 23 Dicembre 2002

p. COIMEX srl UNITED COMPANIES

Il Mandatario



Dr.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



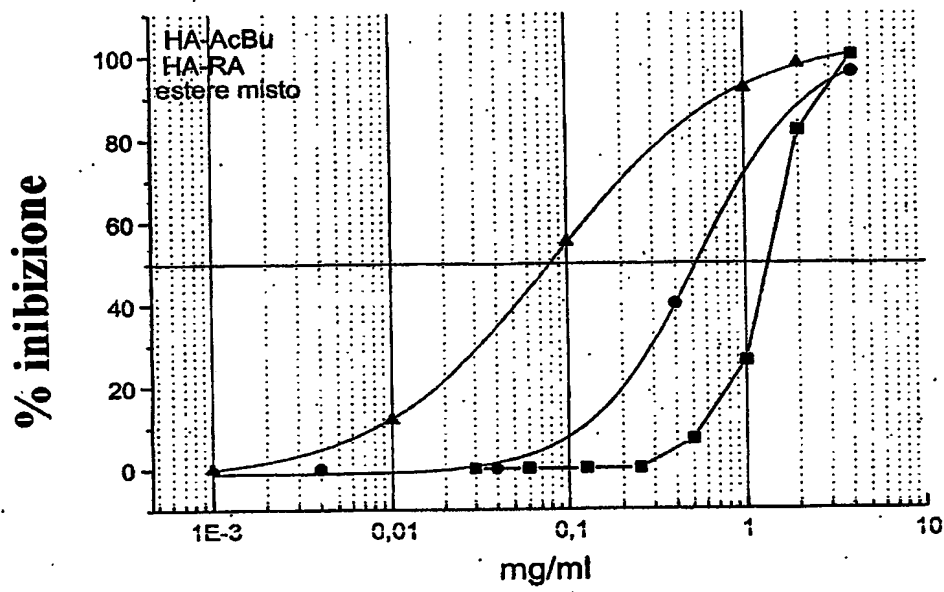
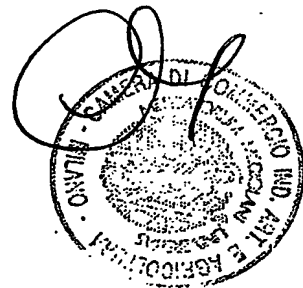


Figura 1

MI 2002A 002745



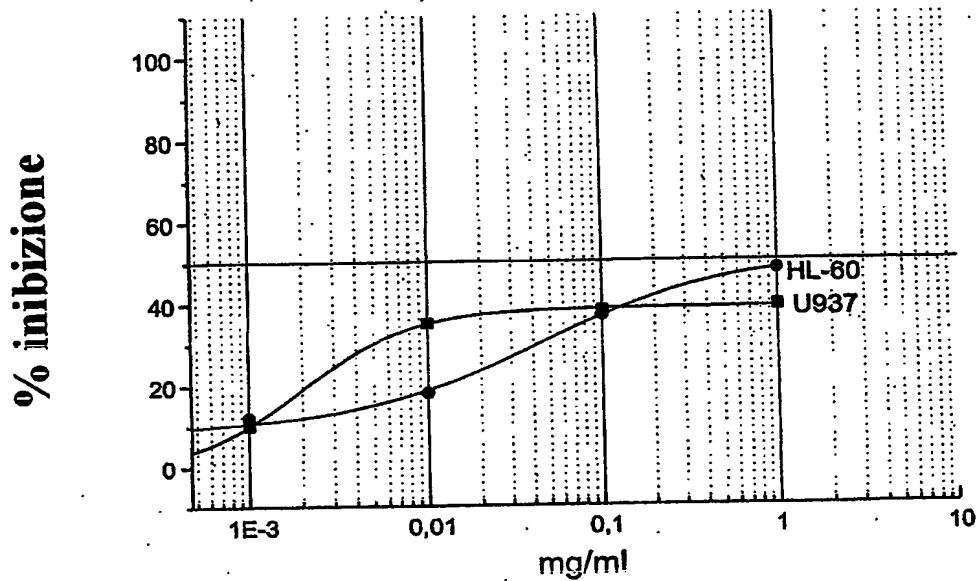
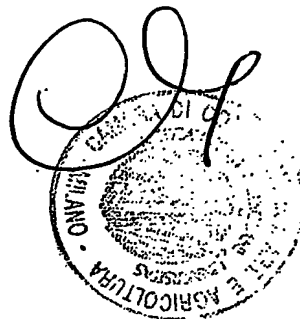


Figura 2

MI 2002A 0 02745



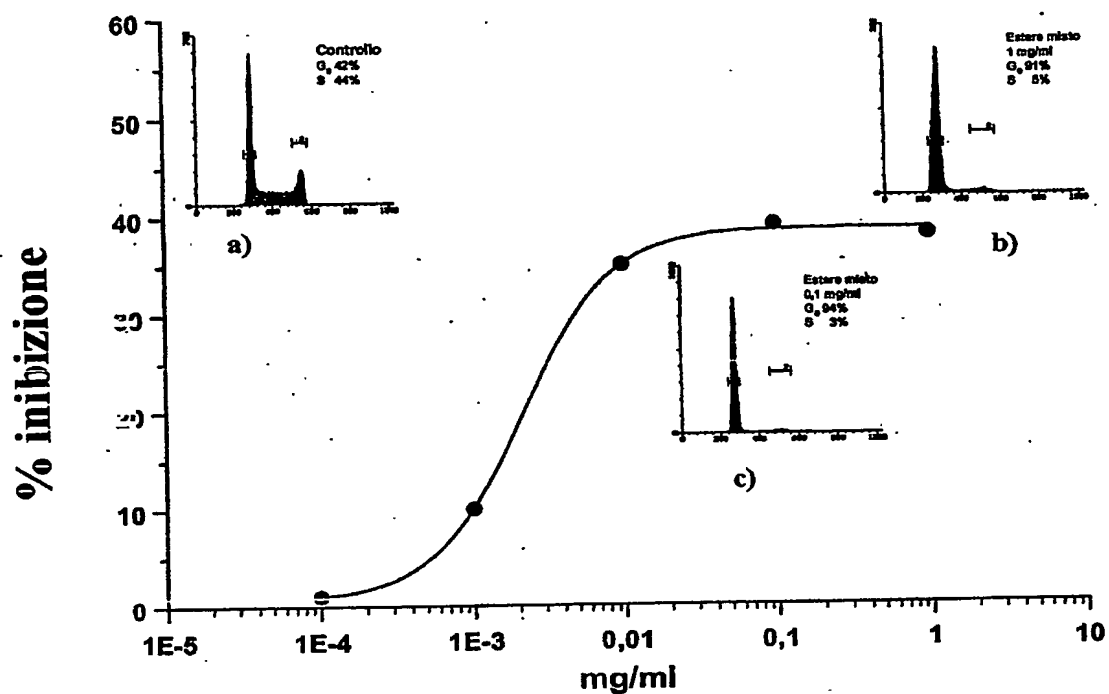


fig 3

MI 2002 A 0 0 2 7 4 5

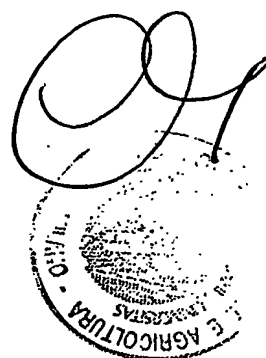
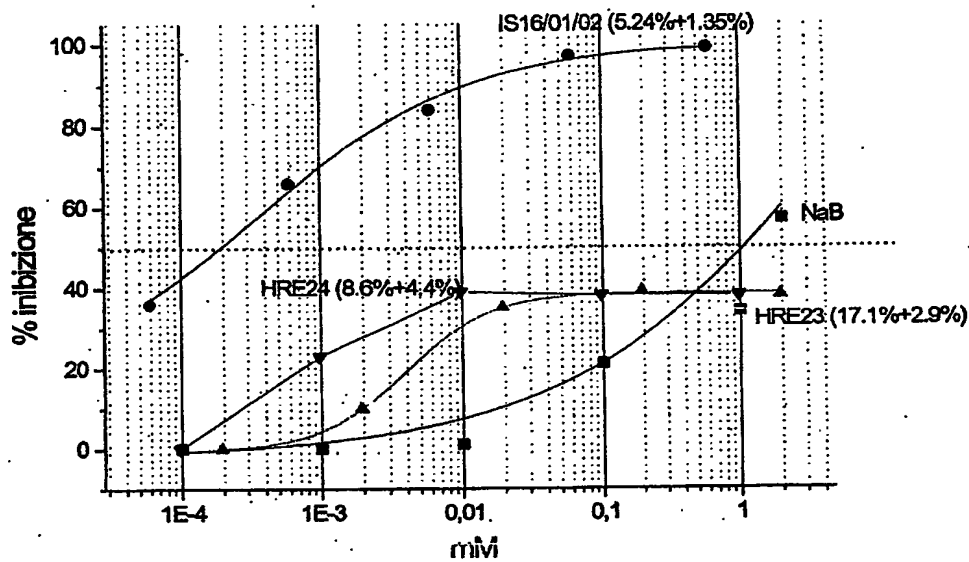


fig 4



MI 2002 A 0 0 2 7 4 5

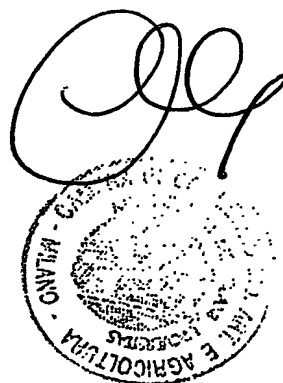
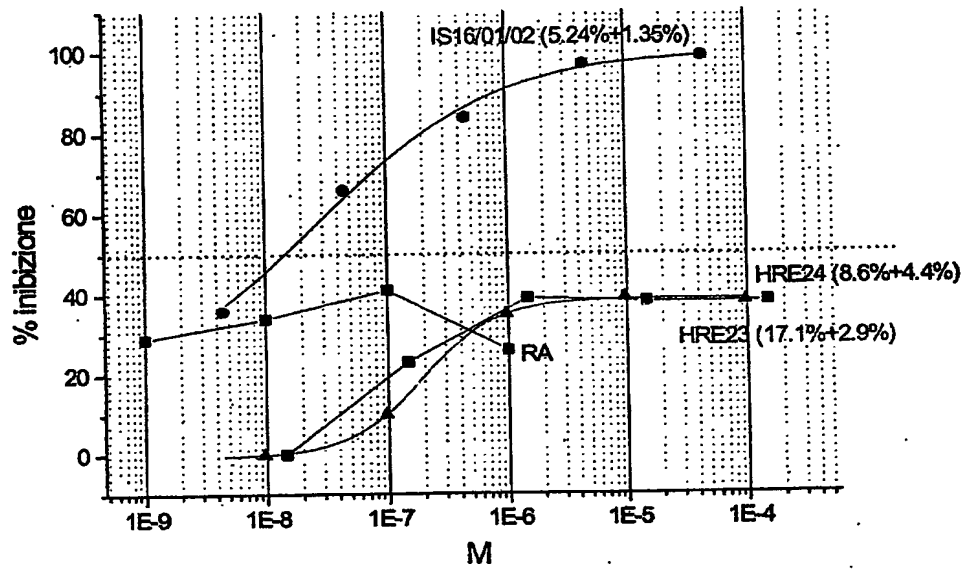
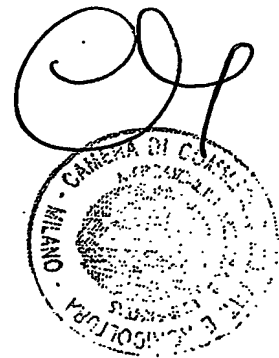


fig 5



MI 2002 A 0 0 2 7 4 5



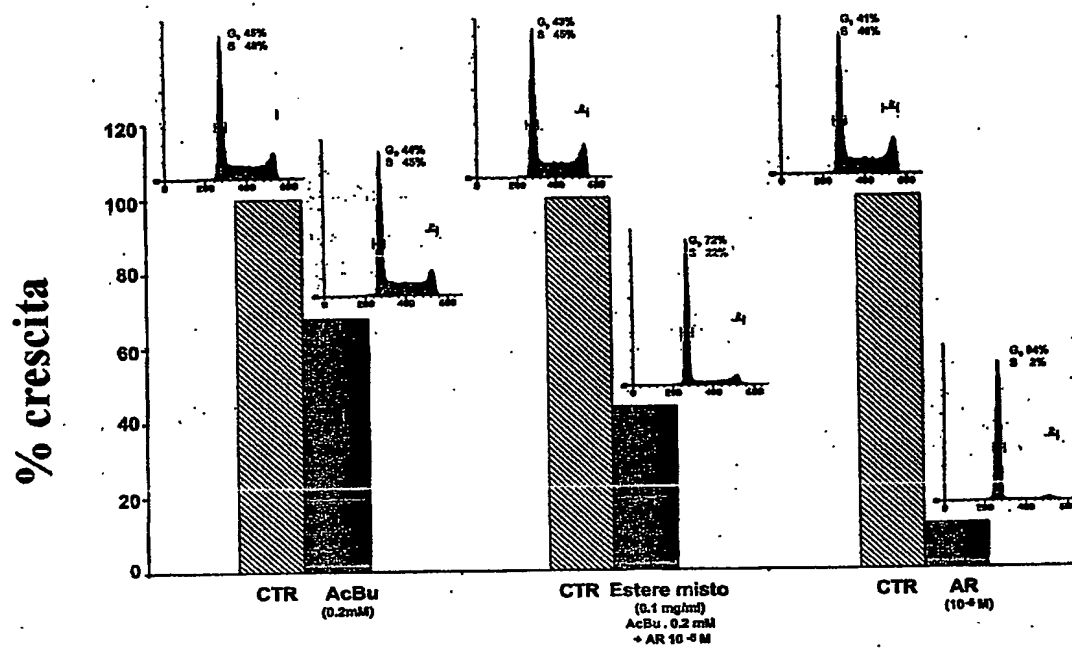


fig 6

MI 2002 A 0 0 2 7 4 5



se far

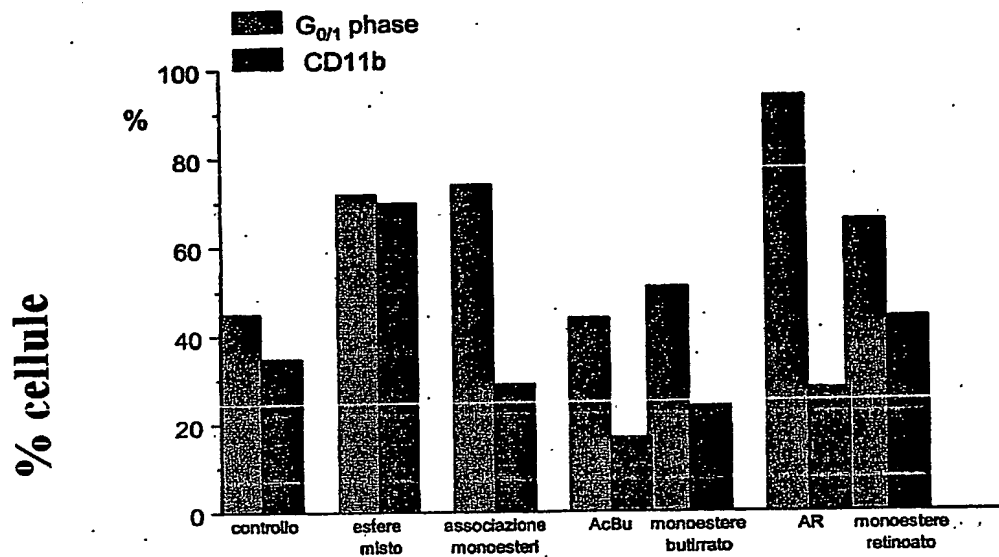


fig.7

MI 2002 A 0 0 2 7 45

Op

